

UTILISATION de FLUOROCHROMES pour L'OBSERVATION
 DES PAROIS CELLULAIRES CHEZ TROIS ESPECES
 DE *CLOSTERIUM* (DESMIDIALES)
 AU COURS DE LEUR REPRODUCTION SEXUÉE

Thérèse DUBOIS-TYLSKI*

RÉSUMÉ. Les parois des cellules végétatives et les zygospores de *Closterium acutum*, *moniliferum* et *venus* sont fortement fluorescentes après coloration par le «Calcofluor white». Cette coloration ne met pas de pores en évidence, mais elle montre qu'une élongation discontinue des hémisomates est possible. Chez *C. moniliferum*, les papilles de conjugaison, la vésicule mucilagineuse qui les entoure puis la paroi des zygospores jeunes et âgées présentent une vive fluorescence. La vésicule de germination est entourée par l'endospore interne fluorescente.

La coloration au bleu d'aniline montre la présence d'une enveloppe callosique mise en place précocement autour de la jeune zygospore et longtemps persistante chez les trois espèces. L'intérêt phylogénique de cette formation mise en évidence pour la première fois autour de cellules sexuées d'Algues est discuté.

SUMMARY. — The walls of vegetative cells and zygospores of *Closterium acutum*, *moniliferum* and *venus* are strongly fluorescent after Calcofluor staining. This staining does not show pores in the wall but indicates that discontinuous elongation of semicells is possible. In *C. moniliferum*, the conjugation papillae, the surrounding mucilaginous vesicle, then the young and old zygospores fluoresce brightly. The germination vesicle is surrounded by the fluorescing inner part of endospore.

Aniline blue staining shows that a callosic sheath is rapidly set around the young zygospores and persists for a long time in the three species. It is the first time that such a callosic wall is mentioned around an algal sexual cell and its possible phylogenetic interest is discussed.

* Université des Sciences et Techniques de Lille, U.E.R. de Biologie, Laboratoire de Cryptogamie, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches des *Closterium acutum* Bréb., *C. moniliferum* (Bory) Ehrenbg. ex Ralfs. et *C. venus* Kütz. utilisées sont des souches homothalliques isolées à l'état végétatif en 1968 dans une mare à Sphaignes du pré communal de Wardrecques (Pas-de-Calais), cultivées sur milieu de Waris (WARIS et ROU-HIAINEN, 1970) gélosé à 1%, à pH 5,4. Seule la souche de *C. moniliferum* est axénique.

La reproduction sexuée est obtenue en soumettant des cultures jeunes à un éclairage de $10\,000 \text{ ergs. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ fourni par des tubes fluorescents Gro-lux selon un cycle photopériodique de 18 heures de lumière et 6 heures d'obscurité à 20°C.

Le Calcofluor white ST* a été utilisé comme colorant vital à la concentration de 0,01% dans le milieu de Waris. D'abord considéré comme un fluorochrome spécifique de la cellulose et de la chitine (HARRINGTON et RAPER, 1968), il s'est avéré ensuite qu'il pouvait se fixer sur de nombreux polysaccharides : cellulose, chitine, hémicelluloses, composés pectiques et callose (HUGUES et Mc CULLY, 1975).

Le bleu d'aniline a été utilisé selon la technique de ESCHRICH et CURRIER (1964), soit sur matériel vivant, soit sur matériel fixé par le glutaraldéhyde à 6% dans le milieu de Waris. La spécificité de cette technique longtemps considérée comme classique pour la mise en évidence de la callose est actuellement très controversée (FAULKNER et coll., 1973; SMITH et Mc CULLY, 1978), et la fixation au glutaraldéhyde pourrait induire un dépôt de callose (HUGUES et GUNNING, 1980).

La primuline en solution aqueuse a été utilisée selon WATERKEYN et BIENFAIT (1971) pour la mise en évidence de la sporopollénine; la callose fluoresce également légèrement avec ce fluorochrome, mais beaucoup moins qu'avec le bleu d'aniline.

L'observation en fluorescence a été effectuée sur un microscope REICHERT Zetopan, avec filtre U.V. 350 nm.

OBSERVATIONS APRES UTILISATION DU CALCOFLUOR WHITE :

Les cellules végétatives du *C. acutum* présentent une fluorescence uniforme, ne mettant en évidence ni croissance intercalaire, ni ceinture ni pores. Les cellules âgées excrètent un mucilage fluorescent réparti irrégulièrement le long de la cellule (Pl. I, fig. 1). La paroi des zygospores jeunes et âgées est uniformément fluorescente et présente des expansions irrégulières persistant dans les hémisomates vidés (Pl. I, fig. 2). Contrairement à ce que laisserait penser la description de KRIEGER (1937), signalant «4 cornes», ces expansions ne sont pas constantes, et il existe des zygotes parfaitement sphériques. Aucune trace

* Gracieusement fourni par American Cyanamid Co, Bound Brooks, N.J., U.S.A.

de «tube» ni de «vésicule de conjugaison» n'a pu être observée. La sexualisation se manifeste par une fluorescence plus intense dans la partie centrale des cellules appariées, les hémisomates s'écartent, les gamètes se contractent plus ou moins complètement puis fusionnent sans aucune protection.

Chez *C. venus*, au moment de la sexualisation, la courbure des cellules s'accroît; les hémisomates s'écartent en émettant dans la partie centrale une papille de conjugaison à croissance apicale, dont la partie terminale se colore vivement par le rouge de ruthénium et présente une fluorescence intense. Les papilles confluent et entre leurs parois distendues se forme une zygospore souvent munie de quatre expansions courtes et arrondies qui persistent dans les hémisomates. La forme arrondie est cependant plus fréquente que la forme anguleuse dans nos conditions de culture (Pl. I, fig. 5). Le zygote est ainsi protégé par un «tube de conjugaison» formé par la réunion des papilles, d'une manière analogue à ce qui se passe chez *C. rostratum* (DUBOIS-TYLSKI, 1973 a) ou chez *Spirogyra*. Il n'y a pas de mucilage apparent à l'extérieur de ce tube mou, formé essentiellement d'hémicelluloses, et les zygospores ne sont pas facilement séparables des gamétocystes vides.

Les aspects sont un peu plus complexes en ce qui concerne *C. moniliferum*. La mise en évidence des composants des parois par la technique de JENSEN (1962) : dissolutions successives par l'oxalate d'ammonium puis par des solutions de soude peu puis très concentrées avec réaction ultérieure à l'acide periodique-Schiff, montre que la paroi des hémisomates anciens, peu réactive à l'A.P.S. et insoluble dans la soude est essentiellement cellulosique. Celle des hémisomates néoformés, des papilles de conjugaison et des vésicules de conjugaison, très réactives à l'A.P.S. est hémicellulosique. Les cellules en conjugaison sont réunies dans leur partie centrale par un mucilage pectique diffus, et les cellules végétatives sécrètent un mucilage pectique qu'elles abandonnent en manchon sur la gélose à mesure qu'elles progressent (fig. 1).



Fig 1 - Sécrétion des vésicules de conjugaison chez *C. moniliferum*. Les papilles réfringentes en contact (1) sécrètent une vésicule de conjugaison hyaline (2) faiblement colorable par le rouge de ruthénium, présentant une réaction A.P.S. positive et une vive fluorescence après coloration au Calcofluor-white. La partie centrale des cellules est réunie par un mucilage diffus (3) peu colorable au rouge de ruthénium, A.P.S. positif et faiblement fluorescent après coloration au Calcofluor-white. Un début de rétraction du cytoplasme (4) s'observe aux extrémités des hémisomates anciens, avec émission de mucilage (5) colorable au rouge de ruthénium, entre la paroi et le plasmalemme.

Toutes ces formations sont fluorescentes de façon plus ou moins intense

après coloration par le Calcofluor-white, les hémicelluloses émettant la fluorescence la plus vive (Pl. II, fig. 1 à 6).

Bien que l'observation des coupes de parois en microscopie électronique ait montré la présence de pores dans la paroi des *Closterium*, le Calcofluor white ne permet pas de les mettre en évidence, comme c'est le cas chez *Cosmarium botrytis* (BERLINER et coll., 1978). MIX (1972) a d'ailleurs montré la différence de complexité de ces deux types de pores. Par contre cette méthode montre qu'une croissance discontinue des hémisomates est possible; la croissance normale des hémisomates formés dans une culture jeune et active est une croissance apicale, mais dans les cultures âgées, des allongements intercalaires peuvent se produire (Pl. II, fig. 5). LEFEVRE (1934) avait déjà signalé ce type de croissance dans le genre *Closterium*.

C'est sur l'organisation des papilles et des vésicules de conjugaison que la méthode apporte le plus d'éclaircissements. Les individus appariés sont entourés par une enveloppe mucilagineuse commune très peu fluorescente. L'émission des papilles de conjugaison se traduit par une fluorescence extrêmement vive, localisée au niveau de la partie interne des hémisomates néoformés. Une vésicule mucilagineuse sécrétée après l'émission des papilles réunit les gamètes dans leur partie centrale. Lorsque les papilles se touchent un «pont» fluorescent réunit les gamètes deux à deux, mais ce n'est pas un véritable tube de conjugaison; les limites n'en sont pas définies. L'observation de gamètes asynchrones (Pl. II, fig. 4 et fig. 2 pour l'explication schématique) montre que l'extrémité de la papille s'ouvre dans une vésicule formée de mucilage diffus et sans limite nette. Les bords de la papille demeurent fortement fluorescents. Le cytoplasme des gamètes se contracte et le contenu du gamétocyste est expulsé dans la vésicule mucilagineuse lâche. Un mucilage fluorescent s'accumule à l'extrémité des gamétocystes qui se vident (Pl. II, fig. 2 et 3).

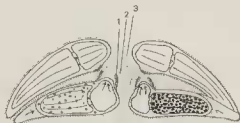


Fig. 2. — Rupture des papilles et sortie des gamètes chez *C. moniliferum*. Une conjugaison asynchrone montre un couple de gamètes qui ne sont encore qu'au stade «émission des papilles de conjugaison» alors que leurs partenaires qui ont émis une papille et élaboré une «vésicule de conjugaison» en sont déjà au stade «rupture de la papille». Le cytoplasme (dont la membrane n'a été figurée qu'aux niveaux où elle est décollée de la paroi) se contracte dans les hémisomates anciens (flèche) et progresse dans la partie néoformée (double flèche). L'extrémité de la papille (1) se rompt sous la poussée du cytoplasme pour former un tube mou, fortement fluorescent après coloration au Calcofluor-white, alors que le mucilage de la vésicule de conjugaison (2) est moins fortement fluorescent. Le mucilage qui réunit la partie centrale des cellules (3) est encore plus diffus.

Les jeunes zygotes ne sont donc entourés que par les restes des papilles de conjugaison et par la vésicule mucilagineuse, et ils se séparent très facilement des gamétocystes vides. Dans de rares cas, la contraction des gamètes est incomplète et la zygospore se forme avec deux expansions arrondies qui demeurent à l'intérieur des hémisomates.

Les zygospores jeunes et âgées sont également fluorescentes après coloration au Calcofluor-white. La paroi acquiert une structure complexe, et l'épaisse endospore des zygotes âgés est essentiellement cellulosique, comme chez *Cosmarium botrytis* (BERLINER et GUTH, 1979). Lors de la germination, la vésicule de germination, longtemps considérée comme un protoplaste, est en réalité entourée par l'endospore interne cellulosique et présente une vive fluorescence (Pl. I, fig. 8).

OBSERVATIONS APRES UTILISATION DU BLEU D'ANILINE :

Les parties végétatives ne présentent aucune fluorescence chez les trois espèces étudiées, de même que les papilles de conjugaison. Par contre les zygospores montrent dès leur formation une fluorescence peu intense mais très nette qui persiste longtemps. La fluorescence est uniforme chez *C. acutum* et chez *C. venus*. Elle est plus intense à certains niveaux chez *C. moniliferum*, en particulier à l'endroit où le gamète reste engagé dans le gamétocyste et où il se forme une sorte de bouchon. Chez *C. moniliferum*, l'exospore du zygote âgé de moins de 48 heures présente au microscope électronique un aspect très clair aux électrons (DUBOIS-TYLSKI, 1973 b). Cet aspect et la fluorescence au bleu d'aniline suggèrent la présence de callose, excrétée dès la formation du zygote. La callose est un polysaccharide très hydrophile, se formant très rapidement et souvent en réponse à un traumatisme (fixation, choc osmotique, choc thermique, blessure, ultrasons...). Dans le cas présent, on pourrait supposer que la callose est un artefact dû au milieu de culture solide sur lequel on force l'algue à se reproduire. Il n'en est rien, et les zygotes formés en milieu aqueux montrent également la fluorescence de la callose qui est donc un constituant «normal» de la paroi. Formée dès que le zygote s'arrondit en dehors des gamétocystes, la callose est associée à des composés pectiques colorables au rouge de ruthénium (Pl. I, fig. 3 et 6; Pl. II, fig. 7).

OBSERVATIONS APRES UTILISATION DE LA PRIMULINE :

En solution aqueuse très diluée, la primuline provoque la fluorescence de la sporopollénine, et dans une moindre mesure celle de la callose. La sporopollénine est faiblement autofluorescente. Elle n'apparaît très nettement qu'autour des zygotes de *C. moniliferum*, où elle forme une couche continue, sans bouchons apparents (Pl. II, fig. 8); nous avons montré précédemment en microscopie électronique la présence de sporopollénine, résistante à l'acétolysc, dans la mésospore du zygote âgé d'au moins 48 heures. La sporopollénine est présente en quantité très faible autour des zygotes de *C. acutum* et de *C. venus* (Pl. I,

fig. 4 et 7).

DISCUSSION

Si la présence de cellulose, d'hémicelluloses et de mucilages pectiques n'est pas surprenante chez les Desmidiées, la callose et la sporopollénine sont rarement citées chez les Algues.

La sporopollénine est signalée par KIES (1970) dans la mésospore du zygote de *Micrasterias papillifera*. Elle a été observée par ATKINSON et coll. (1972) autour des cellules végétatives de quelques souches de *Chlorella*, *Scenedesmus* et *Prototheca*.

La callose existe sous forme de bouchons chez *Mougeotia* et *Spirogyra* (BUER, 1964), dans les siphons de *Caulerpa* (ZAFARALLA et PANTASTICO, 1971), dans les poils de *Coleochaete* (MARCHANT, 1977). A notre connaissance, elle n'a jamais été observée autour d'une cellule sexuelle d'Algue. Par contre elle est très souvent associée aux cellules reproductrices des végétaux dits supérieurs, où elle est diversement répartie dans les organes végétatifs : tiges et soies de Mousses (HÉBANT, 1968), feuilles de Sélaginelles (WATERKEYN et BIENFAIT, 1967), ligule des Sélaginelles (JAGELS et GARNER, 1979), tubes criblés. Connue depuis longtemps (MANGIN, 1889) autour des microspores d'Angiospermes, elle a été plus récemment observée autour des mégaspores de Gymnospermes (DE SLOOVER, 1961) et d'Angiospermes (RODKIEWICZ, 1967, 1970; RODKIEWICZ et GORSKA-BRYLASS, 1967).

D'après BIENFAIT et WATERKEYN (1976), «les Mousses ne forment pas de callose sporocytaire. Outre les Spermatophytes, seules les Hépatiques et les Sélaginelles produisent cette substance au cours de la sporogénèse». HORNER et BELZ (1970) ont ainsi mis en évidence la callose autour des macro- et microsporocytes de Sélaginelles, et DENIZOT (1971) l'observe au cours de la sporogénèse de quelques Marchantiales et Sphaerocarpacees. CAVE et BELL (1973) la signalent autour de spermatocytes de *Ceratopteris*.

Certains *Closterium* nous permettent donc d'observer le premier exemple de la présence d'une enveloppe callosique, au sens classique du terme, autour d'une cellule reproductrice d'Algue verte : la zygospore, qui devient un meiosporocyte au moment de sa germination.

La plupart des auteurs s'accordent à attribuer à la callose un rôle dans l'isolement des cellules sexuelles, et dans la protection contre les chocs osmotiques et la dessiccation. Déjà en 1924, STEINECKÉ voyait dans les Desmidiées un maillon dans l'évolution des Algues vertes vers les plantes terrestres, hypothèse que les travaux cytologiques de PICKETT-HEAPS (synthèse 1979) ont remarquablement étayée. Les Conjugales et les Charales présentent en effet de manière constante au cours de leur division cellulaire un fuseau ouvert et un phragmoplaste, comme les plantes terrestres, par opposition au phycoplaste des Algues primitives. En outre les Algues à phragmoplaste sont équipées de glycolate-oxydase, comme les plantes supérieures, alors que les Algues à phycoplaste sont pourvues de glycolate-déshydrogénase (FREDERICK et coll., 1973).

La faculté de synthétiser de la callose puis de la sporopollénine par certaines Desmidiées apparaît comme une remarquable préadaptation à la vie en milieu aérien, et confirme la place privilégiée de ce groupe d'Algues dans la lignée évolutive qui conduit aux plantes terrestres.

BIBLIOGRAPHIE

- ATKINSON, A.W. Jr., GUNNING, B.E.S. et JOHN, P.C.L., 1972 — Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other Algae. Ultrastructure, chemistry and incorporation of ¹⁴C-acetate studied in synchronous cultures. *Planta* 107 : 1-32.
- BERLINER, M.D. et GUTH, E., 1979 — Zygote formation in *Cosmarium botrytis* studied by scanning and transmission electron, phase contrast and calcofluor staining *Protoplasma*, 101 : 1-10.
- BERLINER, M.D., WOOD, N.L. et DAMICO, J., 1978 — Vital and calcofluor staining of *Cosmarium* and its protoplasts. *Protoplasma*, 96 : 39-46.
- BIENFAIT, A. et WATERKEYN, L., 1976 — Sur la nature des parois sporocytaires chez les Mousses et chez quelques Ptéridophytes. *C. R. Acad. Sci., Série D*, 282 : 2079-2081.
- BUER, F., 1964 — Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zellwänden und Gallerten einiger Zygnemataceen. *Flora*, 154 : 349-375.
- CAVE, C.F. et BELL, P.R., 1973 — The cytochemistry of the walls of the spermatocytes of *Ceratopteris thalictroides*. *Planta*, 109 : 99-104.
- DENIZOT, J., 1971 — Recherche sur les formations callosiques au cours de la sporogénèse de quelques Marchantiales et Sphaerocarpaceles. *C.R. Acad. Sci., série D*, 272 : 2769-2772.
- DUBOIS TYLSKI, Th., 1973 a — La conjugaison en culture *in vitro* chez *Closterium rostratum* Ehrbg. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 120 : 33-42.
- DUBOIS-TYLSKI Th., 1973 b — Étude ultrastructurale de la conjugaison et de la jeune zygospore chez *Closterium moniliferum* (Bory) Ehrbg. *Ann. Sci. nat. Bot. et Biol. vég.* 14 : 41-52.
- ESCHRICH, W. et CURRIER, H.B., 1964 — Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Technology*, 39 : 303-307.
- FAULKNER, G., KIMMINS, W.C. et BROWN, R.G., 1973 — The use of fluorochromes for identification of β -1,3 glucans. *Canad. J. Bot.*, 51 (8) : 1503-1504.
- FREDERICK, S.E., GRUBER, P.J. et TOLBERT, N.E., 1973 — The occurrence of glycolate dehydrogenase and glycolate oxydase in green plants. an evolutionary survey. *Plant. Physiol.* 52 : 318-323.
- HARRINGTON, B.J. et RAPER, K.B., 1968 — Use of fluorescent brightener to demonstrate cellulose in cellular slime molds. *Appl. Microbiol.*, 16 : 106-113.
- HÉBANT, C., 1968 — Observations en microscopie à fluorescence sur la répartition de la callose chez les Mousses. *Nat. Monspel. Bot.*, 19 : 75-78.
- HORNER, H.T. et BELTZ, C.K., 1970 — Cellular differentiation of heterospory in *Selaginella*. *Protoplasma*, 71 : 335-361.
- HUGUES, J.E. et GUNNING, B.E.S., 1980 — Glutaraldehyde induced deposition of callose. *Canad. J. Bot.*, 58 : 250-258.
- HUGHES, J. et Mc CULLY, M.E., 1975 — The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology*, 50 : 319-330.

- JAGELS, R. et GARNER, J., 1979 — Variation in callose deposition in the ligule of seven species of *Selaginella*. *Amer. J. Bot.*, 66 : 963-969.
- JENSEN, W.A., 1962 — Botanical histochemistry. Freeman and Co, San Francisco, London.
- KIES, L., 1970 — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Bildung und Struktur der Zygotenwand bei *Microsterias papillifera* (Desmidiaceae). II. Die Struktur von Mesopor und Endospor. *Protoplasma*, 71 : 139-146.
- KRIEGER, W., 1937 — Die Desmidiaceen. In Rabenhorst's Kryptogamen Flora. Leipzig.
- LEFEVRE, M., 1934 — Sur la division et l'élongation des cellules dans le genre *Closterium* Nitzsch. *C. R. Acad. Sci.*, 198 : 1166-1168.
- MANGIN, L., 1889 — Observations sur la membrane du grain de pollen mûr. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 36 : 274-284.
- MARCHANT, H.T., 1977 — Ultrastructure, development and cytoplasmic rotation of seta-bearing cells of *Coleochaete scutata* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 13 : 28-36.
- MIX, M., 1972 — Die Feinstruktur der Zellwände bei Mesotaeniaceae und Gonatozygaceae mit einer vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Wandtypen der Conjugatophyceae und über deren systematischen Wert. *Arch. Mikrobiol.*, 81 : 197-220.
- PICKETT-HEAPS, J.D., 1979 — Electron microscopy and the phylogeny of green algae and land plants. *Amer. Zoologist*, 19 : 545-554.
- RODKIEWICZ, B., 1967 — Walls with callose in the megaspores and hypostase of ovules of *Anthrrium majus* observed in a fluorescence microscope. *Bull. Acad. Polon.*, V (15) : 493-495.
- RODKIEWICZ, B., 1970 — Callose in cell walls during megasporogenesis in Angiosperms. *Planta*, 93 : 39-47.
- RODKIEWICZ, B. et GORSKA-BRYLASS, 1967 — Occurrence of callose in the walls of meiotically dividing cells in the ovule of *Orchis*. *Naturwissenschaften*, 54 : 499.
- SLOOVER, J.L. de, 1961 — Études sur les Cycadales. I. Méiose et mégasporogénèse chez *Encephalartos poggei* Asch. *Cellule*, 62 : 103-116.
- SMITH, M.M. et Mc CULLY, M.E., 1978 — A critical evaluation of the specificity of aniline blue induced fluorescence. *Protoplasma*, 95 : 229-254.
- STEINECKE, F., 1924 — Die Zygosporie der Zygothycéen als terrestrische Anpassung. *Bot. Archiv.*, 8 : 36-39.
- WARIS, H. et ROUHIAINEN, I., 1970 — Permanent and temporary morphological changes in *Microsterias*. *Ann. Acad. Sci. fenn. AIV Biologica*, 167 : 1-13.
- WATERKEYN, L. et BIENFAIT, A., 1967 — Les émergences callosiques et silicifiées des feuilles de Sélaginelles. *C. R. Acad. Sci.*, série D, 264 : 1608-1611.
- WATERKEYN, L. et BIENFAIT, A., 1971 — Primuline induced fluorescence of the first exine elements and Ubish bodies, p. 108. In «Sporopollenin», BROOKS, J. et coll. édit., Academic Press, Londres, New York.
- ZAFARALLA, M.T. et PANTASTICO, J.B., 1971 — Cytochemical and developmental studies on callose formation in three species of *Caulerpa*. *Philippine Agriculturist*, 54 (7-8) : 345-358.

PLANCHE I

Fig. 1 à 4 : *Closterium acutum*. 1 : individus végétatifs âgés de 2 mois colorés par le «Calcofluor-white», mettant en évidence une sécrétion irrégulière de mucilage. 2 : zygospores âgées d'une semaine, colorées par le «Calcofluor-white»; la paroi des gamétocystes vides auxquels les zygospores demeurent attachées est également fluorescente. 3 : zygospores âgées d'une semaine colorées par le bleu d'aniline; l'enveloppe callosique seule est fluorescente, les gamétocystes vides ne fluorescent pas. 4 : zygospores âgées d'une semaine colorées par la primuline; les gamétocystes vides sont faiblement fluorescents. La forme des zygospores est très variable, avec ou sans «cornes».

Fig. 5 à 7 : *Closterium venus*. 5 : individus végétatifs et zygospores âgées d'une semaine colorés par le «Calcofluor-white»; les zygospores peuvent être arrondies ou munies d'expansions. 6 : zygospores âgées d'une semaine colorées par le bleu d'aniline. 7 : zygospores âgées d'une semaine colorées par la primuline.

Fig. 8 : *Closterium moniliferum* ; vésicule de germination colorée par le «Calcofluor white» qui met en évidence l'endospore interne cellulosique.

L'échelle portée sur chaque figure représente 25 μ m.

PLANCHE II

Closterium moniliferum

Fig. 1 à 6 : coloration par le «Calcofluor-white». 1 : individus appariés. 2 : après bipartition des cellules appariées, émission des papilles de conjugaison hémicellulosiques vivement fluorescentes. 3 : les papilles de conjugaison sécrètent des vésicules de conjugaison mucilagineuses, non nettement délimitées, qui fusionnent et écartent les gamétocystes. Les fig. 2 et 3 montrent à l'extrémité des gamétocystes l'accumulation de mucilage qui accompagne la contraction des gamètes. 4 : conjugaison asynchrone. Un couple de gamètes a émis seulement une ébauche de papille de conjugaison. L'autre montre la rupture de la papille de conjugaison et son ouverture directe dans la vésicule de conjugaison. 5 : zygospores âgées de moins de 24 heures. Un des gamétocystes vides montre des zones annulaires dont la fluorescence est plus ou moins intense, indice des elongations successives de l'hémisomate. 6 : cellule végétative, gamétocystes vides et zygospores âgées de 2 mois.

Fig. 7 : zygospores âgées de moins de 24 heures colorées par le bleu d'aniline. L'enveloppe des gamétocystes vides ne fluoresce pas. L'exospore callosique, mise en place très rapidement, présente souvent des épaisissements au niveau des expansions de la zygospore encore engagées dans les gamétocystes.

Fig. 8 : zygospores âgées de 48 heures, colorées par la primuline qui colore la méso-spore sporopollénique, et très faiblement l'exospore callosique.

L'échelle portée sur chaque figure représente 25 μ m.

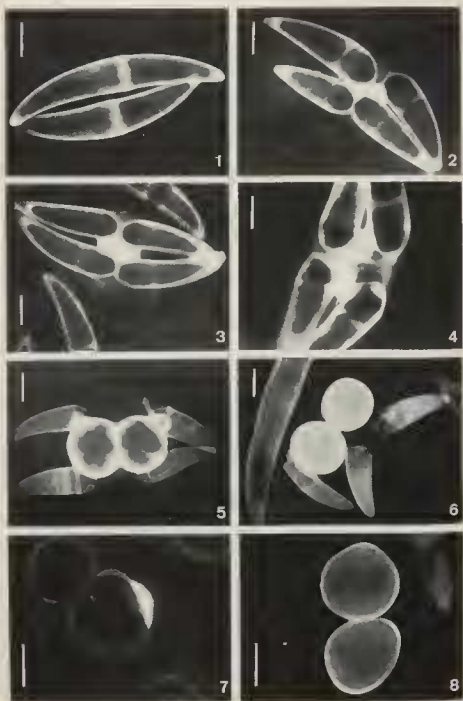


Planche 1



Planche II